（上接第 242 页）

10 min，9000g 离心 10 min；上清中加入 70 μl 7 mol/L NH_4Ac，700 μl 异丙醇，-70℃沉淀 1 h 以上；13000g 离心 10 min，70%冷乙醇洗涤沉淀，自然干燥，加适量 TE8.0（10 mol L Tris，1 mol L EDTA，pH8.0）溶解。0.8%琼脂糖检测 DNA。依同样的方法，分 3 次提取固定标本 DNA，分别进行下续的 PCR 扩增和测序。

1.3 PCR 扩增和测序 引物为扩增 Cytb 307 bp 的通用引物：L14841 5′-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGAAA-3′和 H 15149 5′-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3′。每个反应过程为 40 个循环，一个循环包括：94℃ 1 min，42℃ 1 min，72℃ 1 min。首次循环前 95℃预变性 3 min。每次反应设置不含模板 DNA 的空白对照。2%琼脂糖检测反应产物。低溶点琼脂糖回收 PCR 产物。测序试剂盒购自 USB 公司（Sequenase Version 2.0），测序反应依试剂盒中推荐的方法进行。

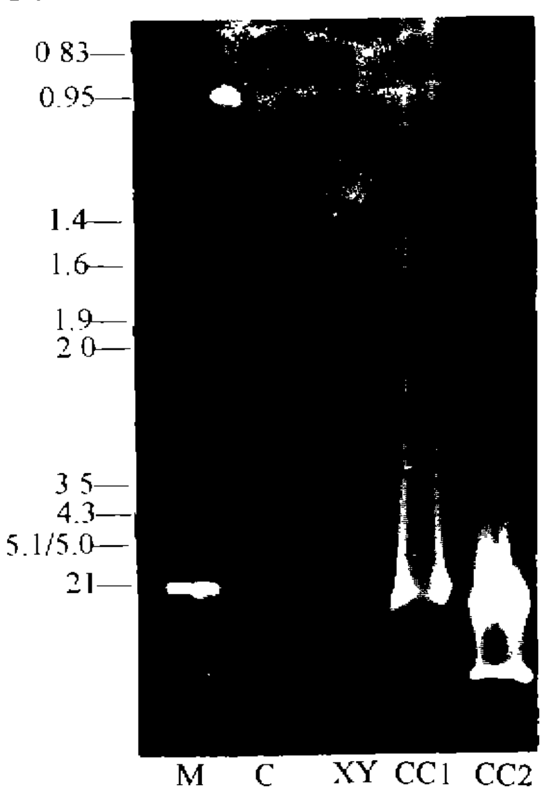


图 1 从固定云南鲴、固定鲤、新鲜鲤组织中提取 DNA 检测结果

Fig.1 The electrophoresis pattern of DNAs extracted from fixed *Xenocypris yunnanensis*, fixed carp and fresh carp

M：λDNA *Hin*dⅢ *Eco*R Ⅰ C：空白对照(control extraction)

XY：固定云南鲴(fixed *Xenocypris yunnanensis*)

CC1：固定鲤(fixed carp) CC2：新鲜鲤(fresh carp)

1.4 数据处理 读取云南鲴部分细胞色素 b 基因序列。为了验证所测定序列的正确性，利用 PC Gene 6.50 从 GeneBank 中查得的 5 种鲤形目（Cypriniformes）鱼类 Cytb 基因，进行同源性比较。

2 结果

2.1 DNA 检测结果如图 1。空白对照中检测不到 DNA；固定云南鲴中 DNA 分子从 1.9 kb 至 0.8 kb，大部分为 1 kb 左右；固定鲤中 DNA 与新鲜样品中 DNA 相比，有部分降解，但大部分片段仍达 50 kb。

2.2 分 4 次提取的固定云南鲴 DNA 以及固定鲤和新鲜鲤 DNA 都扩增出 307 bp 片段。

2.3 可准确读取的云南鲴部分细胞色素 b 基因序列共 121 bp。从 GeneBank 中查得的 5 种鲤形目鱼类（*Lythrurus roseipinnis*，*Notemigonus crysoleucas*，*Opsopoeodus emilae*，*Crossostoma lacustre*，*Cyprinus carpio*）部分 Cytb 基因序列与所读取云南鲴细胞色素 b 基因同源部分如图 2。5 次测序反应所测定的云南鲴序列完全一致。

2.4 从图 2 可看出，在 6 种鲤形目鱼间，云南鲴与鲤序列的同源性最高（84.29%），它们同属鲤科。云南鲴只分布于我国，鲤在我国分布广泛。

（下转第 258 页）

(上接第 252 页)

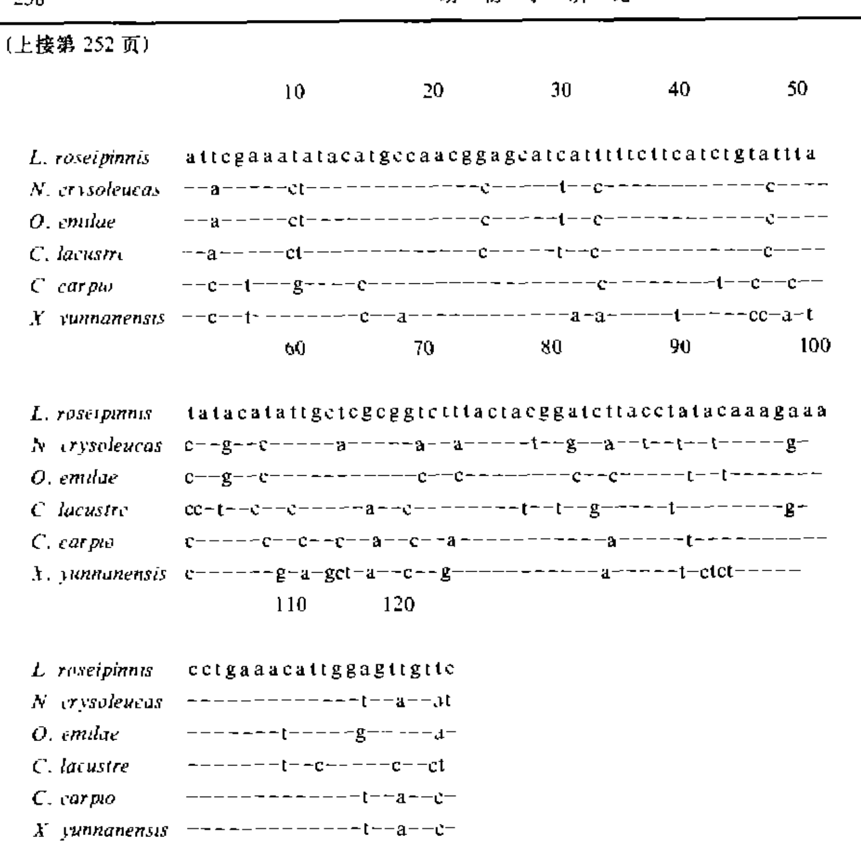


图 2 6 种鲤形目鱼类 mtDNA Cytb 区 121 bp 片段序列排序图

Fig. 2 121 bp Cytb sequences of mtDNA in six fish species belonging to Cypriniformes

打"-"者为相同的序列位点("-"shows the same base pair)。

3 讨论

3.1 福尔马林固定标本的 DNA 提取和序列分析 关于从福尔马林固定标本中提取 DNA 进行分析，最早在医学研究上得到应用。从福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片中提取的 DNA 可用来进行酶切和 Southern 杂交分析。动物死亡后，由于内源性水解作用（endogenous hydrolytic processes），DNA 会很快降解。对于干制标本（皮张、骨骼等），Pääbo 认为：动物死亡后至完全干燥时间的长短决定着标本中 DNA 分子的大小。福尔马林泡制标本，主要是利用甲醛能使蛋白质变性这一特性，以达到防腐的目的。在这一过程中，DNA 酶也随之失活，因此，与干制标本相比，福尔马林浸泡标本应更能有效地保存 DNA。动物死亡后至组织中完全浸透甲醛这一时间的长短可能是决定标本中 DNA 片段大小的关键因素。标本保存时间的长短并不影响 DNA 分子的大小。Shizowa 等（1992）能够从保存近 60 年的鳟鱼

(下转第 284 页)